

文章编号:1005-6947(2005)06-0448-03

· 实验研究 ·

大鼠小肠移植早期排斥反应中肠黏膜细胞凋亡与 IL-1 β 的关系研究

张健, 胡祥

(大连医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 大连 116011)

摘要:目的 明确小肠移植排斥反应中的细胞凋亡现象,并探讨白细胞介素 1 β (IL-1 β) 在凋亡中的作用。方法 选用 SD/Wistar 大鼠进行节段性小肠移植。实验分 3 组:同基因移植组 (SD \rightarrow SD); 异基因移植组 (Wistar \rightarrow SD) 和异基因移植加环孢素 A 治疗组 (Wistar \rightarrow SD + CsA)。术后第 1, 3, 5, 7 天分别用 TUNEL 法检查移植肠上皮凋亡细胞,用 ELISA 法测定血清 IL-1 β 。结果 TUNEL 法显示:Wistar \rightarrow SD 组肠黏膜上皮细胞在其发生轻、中、重度排斥反应中存在细胞凋亡,凋亡细胞数随排斥反应的加重而增加 ($P < 0.01$),并显著高于 SD \rightarrow SD 组 ($P < 0.01$)。Wistar \rightarrow SD + CsA 组细胞凋亡数亦有显著增加 ($P < 0.01$)。SD \rightarrow SD 组排斥反应轻微,凋亡细胞数无明显变化 ($P > 0.05$)。ELISA 法显示:在 SD-SD 组血清 IL-1 β 无明显变化 ($P > 0.05$),Wistar-SD 组和 Wister \rightarrow SD + CsAz 组随凋亡细胞数的增加血清 IL-1 β 亦增高 ($P < 0.01$)。IL-1 β 增加与细胞凋亡指数增加呈正相关 ($r = 0.798, P < 0.01$)。结论 小肠移植排斥反应中存在细胞凋亡现象,IL-1 β 在细胞凋亡发生中起促进作用。

关键词:肠/移植; 移植物排斥; 肠黏膜; 细胞凋亡; 白细胞介素 1 β

中图分类号: R617; R656.7

文献标识码: A

The correlation between apoptosis of intestinal mucosa cells and IL-1 β in early rejection of small bowel allograft in rats

ZHANG Jian, HU Xiang

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Liaoning 116011, China)

Abstract: **Objective** To study apoptosis of small bowel epithelial cells during rejection of small bowel grafts and explore the correlation between apoptosis and cytokine (Interleukin-1 β). **Methods** Heterotopic small intestinal transplantation was performed in SD and Wistar rats. All recipients were divided into three groups: Group I isograft (SD-SD); Group II allograft (Wistar-SD); Group III treatment control (Wistar-SD treated with cyclosporine A). The grafts were harvested on day 1, 3, 5, 7 after operation. All graft samples were examined for apoptotic cells of graft epithelial cells with TUNEL method. Serum IL-1 β levels were detected by sandwich ELISA method. **Results** The TUNEL method showed that in Wistar \rightarrow SD group, apoptosis of intestinal mucosa epithelial cells occurred during mild, moderate and severe rejection, and the number of apoptotic cells increased with increase of severity of rejection ($P < 0.01$), and was significantly higher than in SD \rightarrow SD group ($P < 0.01$). The number of apoptotic cells was also increased in Wistar \rightarrow SD + CsA group ($P < 0.01$). Rejection was mild in SD \rightarrow SD group, and the number of apoptotic cells was not significantly changed ($P > 0.05$). ELISA method showed no significant change of serum IL-1 β in SD \rightarrow SD group ($P > 0.05$), but in Wistar \rightarrow SD group and Wistar \rightarrow SD + CsA group, the serum IL-1 β levels increased as the number of apoptotic cells increased ($P < 0.01$). Increase in level of IL-1 β and increase in number of apoptotic cells showed a significant positive correlation ($r = 0.798, P < 0.01$). **Conclusions**

Apoptotic phenomena are present during rejection of small intestinal graft. IL-1 β can promote the development of cell apoptosis.

收稿日期:2004-11-15; **修订日期:**2005-02-24。

作者简介:张健(1967-),男,锡伯族,辽宁抚顺人,大连医科大学附属第一医院副主任医师,硕士,主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者:张健 电话:0411-83635963-2076。

Key words: Intestines/transpl; Allograft Rejection; Intertones Mucosa; Apoptosis; Interleukin-1 β

CLC number: R617; R656.7

Document code: A

凋亡是发生在生理或病理条件下的一种 DNA 依赖性细胞死亡,是特殊的细胞死亡方式。有研究发现,在动物或临床移植发生排斥反应时,存在细胞凋亡现象^[1~4]。越来越多的证据表明,细胞因子,如白细胞介素 1 β (IL-1 β) 在诱导细胞凋亡中起着重要作用。本实验拟在明确小肠移植早期排斥反应中存在细胞凋亡的前提下,采用血清 ELISA 法检测 IL-1 β ,观察其与凋亡的关系及在凋亡发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年、雄性 SD 及 Wistar 大鼠(分别由大连医科大学、中国医科大学动物中心提供),体重 250 ~ 300g,按分组需要分别作供、受体,每组供、受体鼠各 24 只。用 5g/L 戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉,用显微外科技术制作门腔转流式、移植肠近、远端皮肤造瘘的方法制作节段性小肠异位移植模型。实验分 3 组:(1)同基因移植组(SD \rightarrow SD);(2)异基因移植组(Wistar \rightarrow SD);(3)异基因移植加环孢

素 A 治疗组(Wistar \rightarrow SD + CsA) [10mg/(kg·d)], CsA 术后第 1 天开始腹腔注射。

1.2 标本采集

术后 1,3,5,7d 分别处死大鼠,每次每组 6 只。造瘘口周剪开缝线切取移植肠管,行 TUNEL (TUNEL Kit Roche 公司)法检查凋亡细胞。同时,自内眦静脉取血 2mL,3 000r/min 离心 5min,留取上清液,用酶联免疫吸附试验(ELISA 试剂盒深圳晶美公司)法检测 IL-1 β 。

1.3 统计学处理

数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据处理均采用 SPSS10.0 软件进行方差分析和直线相关分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠小肠移植早期排斥反应中肠黏膜细胞凋亡检验结果

在异基因移植组大鼠术后 1,3,5,7d 均可在肠黏膜上皮中见到凋亡细胞(附图)。

a, b, c, d 分别显示异基因移植组(Wistar-SD)早期排斥反应中 1,3,5,7d 移植肠粘膜隐窝上皮阳性染色的凋亡细胞

附图 大鼠小肠移植早期排斥反应中异基因组移植肠黏膜细胞凋亡的变化($\times 400$)

2.2 大鼠小肠移植早期排斥反应中细胞凋亡与 IL-1 β 变化的关系

术后 1~7d SD \rightarrow SD 组移植肠黏膜上皮细胞凋亡均无明显变化($P > 0.05$),Wistar \rightarrow SD 组肠黏膜上皮细胞凋亡呈加重趋势,与 3,5,7d 时点相比显著高于 SD \rightarrow SD 组($P < 0.01$)。Wistar \rightarrow SD + CsA 细胞凋亡数增加至第 5 天,随着环孢素 A 的应用而

减少($P < 0.01$),但仍高于 SD \rightarrow SD 组($P < 0.01$)。在 Wistar \rightarrow SD 组随移植肠凋亡细胞的增多,血清 IL-1 β 逐渐增高,第 7 天达高峰,在 Wistar \rightarrow SD + CsA 组中 IL-1 β 增高至第 5 天亦开始减少,仍显著高于同时相 SD \rightarrow SD 组($P < 0.01$)。细胞凋亡指数增加与 IL-1 β 含量呈正相关($r = 0.798$, $P < 0.01$)(附表)。

附表 大鼠小肠移植早期排斥反应中细胞凋亡与 IL-1 β 的关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡指数				IL-1 β (pg/mL)			
	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d
SD \rightarrow SD	0.39 \pm 0.06	0.40 \pm 0.07	0.41 \pm 0.06	0.39 \pm 0.07	37.3 \pm 10.1	43.2 \pm 18.5	32.2 \pm 9.6	39.1 \pm 12.2
Wistar \rightarrow SD	0.43 \pm 0.10	0.89 \pm 0.08 ¹⁾	1.42 \pm 0.18 ¹⁾	2.09 \pm 0.19 ¹⁾	42.1 \pm 11.2	52.8 \pm 13.8	66.9 \pm 22.8 ¹⁾	76.7 \pm 29.4 ¹⁾
Wistar \rightarrow SD + CsA	0.45 \pm 0.10 ²⁾	0.94 \pm 0.14 ¹⁾	1.54 \pm 0.19 ¹⁾	1.39 \pm 0.17 ¹⁾	39.1 \pm 10.1	54.3 \pm 18.3 ²⁾	71.1 \pm 23.5 ¹⁾	63.1 \pm 18.2 ¹⁾

注:与 SD \rightarrow SD 组相比,1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

3 讨论

细胞凋亡现象广泛存在于多种生物体中,在胚胎发育、移植免疫、肿瘤发生及组织更新等过程中起重要调节作用^[5,6]。近年来,随着细胞凋亡分子机制的研究进展,发现细胞因子在细胞凋亡中起重要作用^[7-9]。IL-1 β 是由巨噬细胞和其他多种组织细胞产生的激素样多肽,具有广泛的免疫调节作用,同时又有致热和介导炎症的作用^[10],是急性期反应的主要调节因子。血中或局部 IL-1 β 含量异常升高与感染及免疫性疾病、细胞凋亡密切相关^[11]。活化的细胞因子 IL-1 β 系由无活化的 IL-1 β 前体转化而来的。此过程需要一种称为 IL-1 β 转换酶(Interleukin-1 β converting enzyme ICE)的蛋白酶所催化,ICE是一种半胱氨酸蛋白酶。近来发现 ICE 基因与美丽线虫(Caenorhabditis elegans)的细胞自杀基因 Ced-3 有高度同源性,提示 ICE 基因产物可能在细胞凋亡过程中起重要作用^[12]。

有研究认为,凋亡的启动是因为激活了同源性 IL-1 β 转换酶蛋白酶家族,其中包括有 10 种结构类似、功能相同的蛋白酶,它们一方面可以使新合成的 IL-1 β 前体转化为活性 IL-1 β ,另一方面可导致细胞内维持结构和功能的基质蛋白的裂解和通过激活家族内其他成员介导细胞凋亡,但有活性的 IL-1 β 在调控中的具体作用,还有待进一步研究。

有研究发现,应用 LPS, GM-CSF 可使 ICE 和 IL-1 β 在中性粒细胞上表达增加,从而使中性粒细胞凋亡表达趋缓,这种延迟作用可因阻断蛋白质的合成和使用酪氨酸激酶而减弱,应用 IL-1 β 抗体,预先应用 IL-1R 拮抗体孵育或应用使 IL-1 β 失活的核苷酸拮抗 IL-1 β 有同样作用。由此得出结论:IL-1 β 以自分泌形式阻断中性粒细胞凋亡,ICE 的抗凋亡作用乃通过参与 IL-1 β 的转化而实现的,这种 IL-1 β 的自分泌调节机制可能是在炎症时多种因子刺激中性粒细胞凋亡的共同基础。

IL-1 β 是凋亡信号传导中 ICE 的作用底物,其具体作用至今未明。本实验结果显示,手术后第 1 天移植肠出现凋亡细胞,考虑与手术创伤、缺血再灌注损伤有关。之后, Wistar \rightarrow SD 组肠黏膜上皮细

胞凋亡呈加重趋势,在 Wistar \rightarrow SD + CsA 组显示 CsA 对之有一定控制。本实验血清 IL-1 β 变化与移植植物细胞凋亡呈正相关,并且 Wistar \rightarrow SD 组和 Wistar \rightarrow SD + CsA 组显著高于 SD \rightarrow SD 组 ($P < 0.01$)。而 Wistar \rightarrow SD 组和 Wistar \rightarrow SD + CsA 组间同时相比较,血清 IL-1 β 仍随移植植物细胞凋亡变化而变化,说明血清 IL-1 β 在大鼠小肠移植早期排斥反应细胞凋亡中起一定作用。

参考文献:

- [1] Meehan SM, Mccuskey RT, Pascual M, *et al.* Cytotoxicity and apoptosis in human renal allografts: identification, distribution, and quantitation of cells with a cytotoxic granule protein GMP-17 (71A-1) and cells with fragmented nuclear DNA [J]. *Labor Invest.* 1997, 76(10):639-649.
- [2] Searle JW, Baldercon G, Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection [J]. *Transpl*, 1996, 61(2):168-169.
- [3] Todo S, Reyes J, Furukawa H, *et al.* Outcome analysis of 71 clinical intestinal transplantation [J]. *Ann of surg* 1995, 222(6):270-282.
- [4] Misakos Ep, Weppler D, Bakonyi A, *et al.* Clinical outcome of intestinal transplantation at the University of Miami [J]. *Transpl proceed*, 1999, 31(7):569-571.
- [5] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis-Its significance in cancer and therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73(8):2013-2026.
- [6] Ogawa N, Dang H, Taii N. Apoptosis and autoimmunity [J]. *Autoimmunity*, 1995, 8(1):1-19.
- [7] Cerwenka A, Kovar H, Majdic O, *et al.* Fas and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-B [J]. *Immunol*, 1996, 156(3):459-463.
- [8] Mor F, Cohen IR. IL-2 rescues antigen specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis [J]. *Immunol.* 1996, 156(11):515-518.
- [9] Wei S, Liu J, Epling-Burnette PK. Critical role of lynkinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [J]. *Immunol*, 1996, 151(3):5155-5162.
- [10] Herrmann F. Interleukin-1 induces T cell production of granulocyte macrophage colonizing-stimulating factor [J]. *Clin Invest*, 1998, 18(1):415-418.
- [11] Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery [J]. *FASEB*, 1994, 8(5):1314-1325.
- [12] Yuan J, Shaham S, Ledoux S, The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme [J]. *Cell*, 1993, 75(6):641-652.